

慢性阻塞性肺疾病加重期和稳定期 Th17 和 Treg 细胞的表达

陈 钢¹, 谢灿茂^{1*}, 罗志扬², 李敏菁², 张培芳²

(1.中山大学附属第一医院呼吸内科,广东广州 510080; 2.佛山市第一人民医院呼吸内科,广东 佛山 528000)

摘要:【目的】探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性加重期、稳定期患者和肺功能正常吸烟者外周血中 Th17、Treg 细胞的表达。【方法】选取慢性阻塞性肺疾病急性加重患者 28 例、慢性阻塞性肺疾病稳定期患者 22 例、吸烟肺功能正常者(对照组)22 例为研究对象。流式细胞术检测外周血中 Th17 细胞、CD4⁺CD25^{high} Treg 细胞的比例,ELISA 检测诱导痰 IL-17、TGF- β 1 的水平。【结果】急性加重期 COPD 组的外周血 Th17 比例(%)较稳定期 COPD 组增高(2.92 ± 0.16 vs 1.25 ± 0.14 , $P < 0.001$)、痰液 IL-17 水平(ng/L)较稳定期 COPD 组增高(82.33 ± 17.38 vs 12.64 ± 2.74 , $P < 0.001$)、外周血 Treg 比例(%)低于稳定期 COPD 组(8.52 ± 0.47 vs 11.45 ± 0.78 , $P < 0.001$)。急性加重期 COPD 组、稳定期 COPD 组外周血中 Th17 比例与 Treg 比例均呈负相关(r 分别为 -0.723 和 -0.674 , P 均 < 0.001)。【结论】急性加重期 COPD 的气道局部和全身的免疫反应以促炎的“Th17 反应”占优势,稳定期 COPD 以“Treg 反应”占优势。

关键词:慢性阻塞性肺疾病;Th17 细胞;IL-17;调节性 T 细胞

中图分类号:RR563 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)06-0917-05

Expression of Th17 Cells and Tregs in SCOPD and AECOPD

CHEN Gang¹, XIE Can-mao^{1*}, LUO Zhi-yang², LI Min-jing², ZHANG Pei-fang²

(1.Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2.Department of Respiratory Medicine, The First people Hospital of Foshan, Foshan 528000, China)

Abstract:【Objective】To investigate the expression of Th17 cells and Tregs in peripheral blood from the patients of stable chronic obstructive pulmonary disease (SCOPD) and chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD).【Methods】28 patients of AECOPD, 22 outpatients of SCOPD and 22 smoking healthy donors were recruited. Th17 cells and CD4⁺CD25^{high} Tregs were determined by flow cytometry. Concentrations of IL-17 and TGF- β in the sputum were detected by ELISA.【Results】Percentages of peripheral Th17 cells ($2.92 \pm 0.16\%$) in AECOPD were significantly higher than those in SCOPD ($1.25 \pm 0.14\%$, $P < 0.001$), Level of IL-17 in sputum (82.33 ± 17.38 ng/L) in AECOPD was significantly higher than those in SCOPD (12.64 ± 2.74 ng/L, $P < 0.001$). Percentages of peripheral Treg cells ($8.52 \pm 0.47\%$) in AECOPD were significantly lower than those in SCOPD ($11.45 \pm 0.78\%$, $P < 0.001$). Remarkably negative correlations were seen between numbers of Th17 cells and Tregs in AECOPD ($r = -0.723$, $P < 0.001$) and SCOPD ($r = -0.647$, $P < 0.001$).【Conclusions】Th17 response was dominated in AECOPD whereas Treg response was dominated in SCOPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; Th17 cells; interleukin-17; regulatory T cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6):917-921]

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是世界范围内危害人类健康的疾病,反复发生的气道慢性炎症在 COPD 的

生、发展中起了重要作用。中性粒细胞的募集和活化是 COPD 发病中的一个关键环节。辅助性 T 细胞 17(T help cell 17, Th17)细胞是近年来新发现

收稿日期:2013-07-12

基金项目:佛山市科技局医学类科技攻关项目(201108076)

作者简介:陈钢,博士研究生,副主任医师,研究方向:慢性气道炎症, E-mail:cgang@fsyyy.com; * 通信作者,谢灿茂,教授, E-mail: xiecanmao@163.com

的 CD4⁺ T 细胞,其分泌的白介素-17(interleukin 17, IL-17)具有强大的招募中性粒细胞功能^[1]。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是一群具有调节免疫功能的 T 细胞,能够抑制过强的免疫反应,主要表现在诱导免疫失能和免疫抑制两个方面。Treg 通过细胞接触,或分泌转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等抑制性细胞因子,抑制效应性 T 细胞的分化及功能,是诱导和维持外周免疫耐受的重要细胞^[2],目前研究较多的是 CD4⁺CD25⁺Treg。Th17 和 Treg 平衡在维持体内免疫环境中起重要作用,在分化过程中两者相互抑制,失衡可引起局部或者全身异常的免疫反应,和自身免疫性疾病、肿瘤、感染^[3]等疾病密切相关。目前关于 COPD 患者中 Th17 及 Treg 的研究较少,我们通过比较 COPD 急性加重、稳定期及健康人群 Th17 和 Treg 的细胞构成和细胞因子分泌情况,进一步了解 Th17 和 Treg 在 COPD 中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

收集 2011 年 8 月至 2012 年 10 月在佛山市第一人民医院呼吸内科住院的慢性阻塞性肺疾病急性加重患者、呼吸内科门诊随访的慢性阻塞性肺疾病稳定期患者及保健中心体检人群。慢性阻塞性肺疾病急性加重组(AECOPD 组)28 例,均为男性,年龄(67.57 ± 5.78)岁,纳入标准:①符合 2007 年修订版《慢性阻塞性肺疾病诊断指南》^[4];②年龄 55 ~ 75 岁;③吸烟指数 > 300;④有急性加重表现:气促加重、痰量增加和痰转脓性。慢性阻塞性肺疾病稳定期组(SCOPD 组)22 例,均为男性,年龄(68.73 ± 6.09)岁,纳入标准:符合上述 ① ~ ③;近 3 个月内无急性加重史。排除标准:①合并其他肺部疾病或其他系统感染;②有严重的其他系统疾病或恶性肿瘤。吸烟肺功能正常组(对照组)22 例,均为男性,年龄(62.73 ± 5.66)岁,为无慢性心肺疾病的我院健康体检者,吸烟指数 > 300。所有研究对象均签署知情同意书。本研究经过佛山市第一人民医院伦理委员会批准。

1.2 主要仪器及试剂

美国森迪斯公司 Vmax229 肺功能仪,美国 BD 公司的 FACS Calibur 型流式细胞仪,别藻蓝素

(lophycocyanin, APC) 标记的抗人 CD3 单克隆抗体,异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗人 CD4 单克隆抗体,藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗人 CD25 单克隆抗体购自美国 BD 公司,PE 标记的抗人 IL-17A 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司,佛波酯、离子霉素、莫能菌素购自美国 Sigma 公司。人细胞因子 IL-17、TGF- β 1 的酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自 R&D 公司。

1.3 肺功能检测

参照美国胸科协会肺功能检查操作规范进行常规肺功能检测。

1.4 流式细胞仪检测

1.4.1 外周血标本采集及单个核细胞的分离 受试者抽取清晨空腹静脉血 5 mL,抗凝、稀释、离心及洗涤后,收集离心细胞制成外周血单个核细胞液(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)悬液,调整 PBMC 密度至 2×10^6 个/mL,用于流式细胞术检测。

1.4.2 Th17 细胞检测 取 PBMC 1 mL 加入佛波酯(终浓度 50 ng/mL)、离子霉素(1 μ g/mL)、莫能菌素(0.7 μ g/mL)和布菲尔德菌素(1 μ g/mL)置 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 6 h。取出细胞悬液转移至流式管中(1×10^6 个/管)并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤离心,加入 100 μ L 破膜剂、10 μ L 抗人 CD3-APC 单克隆抗体、20 μ L 抗人 CD4-FITC、5 μ L 抗人 IL-17A-PE 抗体或同型对照 IgG,振匀后置避光孵育 30 min,用 PBS 洗涤后弃上清,用 10 g/L 多聚甲醛固定液 0.5 mL 固定,4 $^{\circ}$ C 保存待上机检测。采集 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞 2 000 个,数据分析采用 Cellquest 软件。

1.4.3 CD4⁺ CD25^{high} 调节性 T 细胞检测 以 CD4⁺ CD25^{high} T 细胞比例作为 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例进行研究^[5]。取 PBMC 至流式管中(1×10^6 个/管),加入 10 μ L 抗人 CD3-APC 单克隆抗体、10 μ L 抗人 CD4-FITC、10 μ L 抗人 CD25-PE 或同型对照 IgG 并振匀,避光孵育 15 min,用 PBS 洗涤后弃上清并用 10 g/L 多聚甲醛溶液(0.5 mL)固定,4 $^{\circ}$ C 保存待上机。采集 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞 2 000 个,设门确定出淋巴细胞的分布位置,计算 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞中 CD25^{high} 细胞的百分率。将平均荧光强

度为 CD4⁺CD25⁺ 细胞群两倍的细胞群定义为 CD4⁺CD25^{High} T 淋巴细胞,数据分析采用 Denovo Software 公司开发的 FCS Express 4 软件。

1.5 ELISA 检测诱导痰 IL-17、TGF- β 1 水平 入选研究对象于清晨进行高渗盐水诱导痰处理。诱导前 10 min 吸入沙丁胺醇 400 μ g, 30 g/L 高渗盐水超声雾化吸入 15 min,用力咯痰至培养皿。用镊子取出痰液黏稠、密度大的部分,与唾液严格区分后收集。称重,加入 4 倍体积的 0.1%二硫苏糖醇充分混合, 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,网筛过滤, 2 000 r/min($r = 8$ cm)离心 10 min 沉淀细胞,处理后上清液-80 $^{\circ}$ C冻存。取上述冻存的上清液,通过 ELISA 双抗体夹心法检测细胞因子 IL-17、TGF- β 1,具体操作按照试剂盒提供的说明书进行。

1.6 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行分析数据。计量资料数据以均值 \pm 标准差表示, 各组间差异性比较进行方差齐性检验, 方差齐采用单因素方差分析 LSD 法; 方差不齐采用 Kruskal-Wallis 法, 两两比较采用非参数 Wilcoxon 秩和检验。相关分析采用 Spearman 相关法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。 P 均为双侧。

2 结 果

2.1 AECOPD 组、SCOPD 和对照组一般资料和基础肺功能比较

AECOPD 组、SCOPD 组和对照组年龄差异无统计学意义。3 组吸烟指数、第 1 秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, VFEV1)、VFEV1 与用力肺活量(forced vital capacity, VFVC)的比值(rFEV1/FVC)、FEV1 占预计值百分数(PFEV1/pred)差异有统计学意义。两组基本情况和基础肺功能指标见表 1。

2.1 AECOPD 组、SCOPD 和对照组一般资料和基础肺功能比较

AECOPD 组、SCOPD 组和对照组年龄差异无统计学意义。3 组吸烟指数、第 1 秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV1)、FEV1 与用力肺活量(forced vital capacity, FVC)的比值(FEV1/FVC)、FEV1 占预计值百分数(FEV1/pred)差异有统计学意义。两组基本情况和基础肺功能指标见表 1。

2.2 三组 Th17、Treg 细胞及炎症因子的比较

表 1 AECOPD 组、SCOPD 组和对照组的基本情况和基础肺功能指标

| | AECOPD($n = 28$) | SCOPD($n = 22$) | Control ($n = 22$) | F | P |
|---------------|--------------------|-------------------|----------------------|--------|--------|
| Age/years | 68 \pm 6 | 69 \pm 6 | 63 \pm 6 | 0.659 | 0.712 |
| Smoking index | 753 \pm 298 | 816 \pm 387 | 653 \pm 267 | 9.675 | <0.001 |
| VFEV1/L | 1.00 \pm 0.17 | 1.16 \pm 0.29 | 2.99 \pm 0.44 | 674.9 | <0.001 |
| rFEV1/FVC/% | 49 \pm 6 | 55 \pm 9 | 81 \pm 5 | 987.6 | <0.001 |
| PFEV1/pred/% | 38 \pm 5 | 44 \pm 6 | 107 \pm 13 | 2021.3 | <0.001 |

V_{FEV1} : forced expiratory volume in one second; $r_{FEV1/FVC}$: ratio of V_{FEV1} against forced vital capacity (VFVC); $P_{FEV1/pred}$: percent of forced expiratory volume in one second in prediction.

表 2 三组 Th17、Treg 细胞及炎症因子的比较

Table 2 Comparison of Th17, Treg cell and inflammation factor of 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

| Group | Th17/% | Treg/% | Sputum IL-17/(ng/L) | Sputum TGF- β 1/(ng/L) | Th17/Treg/% |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| AECOPD ($n = 28$) | 2.92 \pm 0.16 ¹⁾²⁾ | 8.52 \pm 0.47 ¹⁾²⁾ | 82.33 \pm 17.38 ¹⁾²⁾ | 1 453.20 \pm 205.34 ¹⁾²⁾ | 39.33 \pm 4.92% ¹⁾²⁾ |
| SCOPD ($n = 22$) | 1.25 \pm 0.14 | 11.45 \pm 0.78 ²⁾ | 12.64 \pm 2.74 | 769.04 \pm 54.21 ²⁾ | 12.81 \pm 1.75% ²⁾ |
| Control ($n = 22$) | 1.35 \pm 0.11 | 4.97 \pm 0.24 | 4.22 \pm 1.52 | 53.84 \pm 11.24 | 27.69 \pm 2.09% |
| H | 42.80 | 42.51 | 28.18 | 49.00 | 29.66 |
| P | < 0.001 | < 0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

1) compared with stable COPD, $P < 0.05$; 2) compared with control, $P < 0.05$.

AECOPD组、SCOPD组和对照组外周血 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞中 Th17 细胞的比例、外周血 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞中 Treg 细胞的比例、诱导痰中 IL-17 水平、诱导痰中 TGF-β1 水平以及外周血 CD3⁺CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞和 Treg 细胞比值的比较见表 2,经 Wilcoxon 秩和检验 SCOPD 和对照组的 Th17 细胞比例、诱导痰中 IL-17 水平无统计学差异,其它两两比较均有统计学差异。

2.3 相关性分析

相关分析结果显示,AECOPD 和 SCOPD 中的外周血 Th17 比例与气道局部 IL-17 水平呈正相关 (r 分别为 0.923 和 0.537, P 分别为 < 0.001 和 0.048);上述两组患者中外周血 Treg 比例与气道局部 TGF-β1 水平亦呈正相关 (r 分别为 0.736 和 0.501, P 分别为 0.003 和 0.018);AECOPD 和 SCOPD 中的外周血 Th17 比例与 Treg 比例呈负相关(r 分别为-0.723 和-0.674, P 均 < 0.001)。而在健康对照组中,未见这些相关关系。

3 讨 论

本研究发现 AECOPD 患者外周血中 Th17 细胞比例和痰液 IL-17 水平均增高,而 Treg 细胞比例低于 SCOPD 患者。通过计算外周 Th17/Treg 比值,可反映 COPD 疾病时机体的全身炎症状态。AECOPD 外周血 Th17 比例与 Treg 比例呈负相关, Th17/Treg 比值较 SCOPD 和对照组增高,提示 AECOPD 全身免疫反应程度升高。与此相对的是, SCOPD 的外周血 Th17/Treg 比值较对照组明显降低,提示 SCOPD 的免疫状态以控制全身炎症反应为主,炎症则较 AECOPD 有所缓解。上述这些结果提示,由于促炎的“Th17 反应”过度增强而 Treg 所介导的免疫调节反应相对不足,导致 AECOPD 的“Th17/Treg(即促炎/抑炎)”免疫平衡被打破,出现了气道局部和全身的促炎反应。SCOPD 中也存在外周血 Th17 比例与 Treg 比例的负相关, SCOPD 的 Treg 比例远高于 AECOPD 者,并且具有较低的外周血 Th17/Treg 比值,提示 SCOPD 以“Treg 反应”占优势。

对于 Th17 细胞和 IL-17 在 COPD 稳定期的作用,目前存在争议。Barczyk 等^[6]通过 ELISA 检测 COPD 患者与健康志愿者诱导痰中 IL-17 水平,发现 IL-17 在 COPD 稳定期表达不增加。Doe 等^[7]通

过活检发现 COPD 组与不吸烟的对照组相比,支气管黏膜下 IL-17A⁺ 细胞增加,但和肺功能正常的吸烟者无差异。而石建邦等^[8]发现,与肺功能正常的吸烟者相比,COPD 稳定期患者外周血 IL-17 水平明显增高,且与气流受限程度呈负相关。各项研究的结论不同可能是因为 COPD 异质性太高。本研究为减少偏倚,仅以男性、吸烟的重度 COPD 患者为研究对象。本研究发现 COPD 稳定期的 Th17 细胞比例和 IL-17 与肺功能正常的吸烟者无差异,且与肺功能无相关。这和 Doe^[7]的结论是一致的。细菌和病毒感染是 IL-17 表达增加的因素,也是 COPD 急性加重的主要原因^[9],这可能与本研究 AECOPD 组 IL-17 表达增加有关。AECOPD 组外周血中 Th17 细胞比例显著地高于 SCOPD 组以及对照组,反映 AECOPD 炎症加剧,提示可以将 Th17 细胞作为 AECOPD 炎症反应的观测指标。

Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性,其控制免疫应答的生理意义在于一方面可使感染信号持续存在,以维持记忆细胞的生成,另一方面可以防止引起组织破坏的病理性免疫应答发生。COPD 是慢性气道炎症,且炎症从肺部“溢出”,引起全身炎症反应,因此从 Treg 的功能上推测,在 COPD 患者体内 Treg 细胞的数量应该是减少的。有一项研究支持这种观点,轻中度 COPD 患者外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞、CD4⁺CD25^{high}T 细胞比例较健康人群明显降低^[10]。但多项研究表明,COPD 患者体内 Treg 细胞的数量较健康人群增加。Lee 等^[11]发现 COPD 患者急性发作期和肺气肿患者肺组织和外周血中 Treg 细胞明显较正常人增加。Smyth 等^[12]发现 COPD 患者和吸烟者肺泡灌洗液中 CD4⁺CD25⁺T 细胞的数量增加,推测这些细胞可能已经失去调节功能,使得机体免疫调节功能降低。本研究表明 COPD 稳定期 Treg 细胞数量较肺功能正常吸烟者明显升高,与 Smyth 等^[12]观测的一致。但本研究显示 COPD 稳定期痰液 TGF-β1 也升高,且和 Treg 细胞比例呈正相关,表明 COPD 稳定期 Treg 细胞功能正常。可能的机制是肺部慢性炎症诱发 Treg 反应,生理意义在于减轻了肺部炎症,但另一方面也使肺部病原菌难以清除,导致慢性感染持续存在,同时由于 TGF-β1 在肺组织表达增多,对慢性阻塞性肺疾病损伤过度修复,导致气道重塑。

综上所述,AECOPD、SCOPD 外周血中 Th17 比例与 Treg 比例均呈负相关,提示 COPD 存在 Th17/Treg 失衡。AECOPD 患者外周血中 Th17 细胞比例显著地高于 SCOPD 组及对照组,以“Th17 反应”占优势;提示可以将 Th17 细胞作为 AECOPD 炎症反应的观测指标。稳定期 COPD 外周血 Treg 细胞比例增高,以“Treg 反应”占优势。

参考文献

- [1] Fujiwara M, Hirose K, Kagami S, et al. T-bet inhibits both TH2 cell-mediated eosinophil recruitment and TH17 cell-mediated neutrophil recruitment into the airways [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2007, 119 (9): 662-670.
- [2] Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function [J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7 (5): 370-375.
- [3] Crowe CR, Chen K, Pociask DA, et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection [J]. *Immunol*, 2009, 183 (8): 5301-5310.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2007, 30(1): 8-17. Group of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Chinese Society of Respiratory Diseases. Guideline for diagnosis and treatment of COPD (2007 revised edition) [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2007, 30(1): 8-17.
- [5] 叶军, 陈亚宝, 徐洪涛, 等. 流式细胞术不同设门方法对 CD4+CD25+调节性 T 细胞的检测方法比较[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2010, 16(5): 495-498. Ye J, Chen Y, Xu H, et al. Different gating methods for measurement of CD4+CD25+Treg cells by flow cytometry [J]. *Chin J Biomed Eng*, 2010, 16(5): 495-498.
- [6] Barczyk A, Pierzchala W, Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine [J]. *Respir Med*. 2003, 97(9): 726-733.
- [7] Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD [J]. *Chest*, 2010, 38(9): 1140-1147.
- [8] 石建邦, 徐晓玲, 夏淮玲, 等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期患者和肺功能正常吸烟者外周血中 Th17 细胞的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 835-838. Shi J, Xu X, Xia H, et al. Expression and significance of peripheral blood Th17 cells in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease and smokers with normal lung function [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2012, 47(7): 835-838.
- [9] 陈钢, 谢灿茂, 罗益峰, 等. 口服糖皮质激素治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重的疗效和疗程研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(8): 577-580. Chen G, Xie C, Luo Y, et al. The effects and therapeutic duration of oral corticosteroids in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary diseases [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2008, 31(8): 577-580.
- [10] Domagala-Kulawik J, Hoser G, Dabrowska M, et al. CD4+ /CD25+ cells in systemic inflammation in COPD [J]. *Scandinavian J Immun*, 2011, 73(9): 59-65.
- [11] Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema [J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 567-569.
- [12] Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, et al. CD4-regulatory cells in COPD patients [J]. *Chest*, 2007, 132(9): 156-163.

(编辑 孙慧兰)